

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas- Bacharelado

Avaliação do efeito do flavonoide morina no cultivo das células-tronco mesenquimais.

Susana Aschidamini Ferreira

Porto Alegre, junho de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas- Bacharelado

Avaliação do efeito do flavonoide morina no cultivo das células-tronco mesenquimais.

Susana Aschidamini Ferreira

Professora Dr.^a Patricia Pranke
Orientadora

Dr.^a Natasha Maurmann
Co-orientadora

Artigo redigido conforme normas da Revista *Phytomedicine*

Porto Alegre, junho de 2015

Título

Avaliação do efeito do flavonoide morina no cultivo das células-tronco mesenquimais.

Autores

Susana Aschidamini Ferreira ¹

Natasha Maurmann ^{1,2}

Patricia Pranke ^{1,2,3}

Instituições

1 Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia;

2 Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia; Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS;

3 Instituto de Pesquisa com Células-tronco - IPCT

Endereço: suhaschi@gmail.com

Resumo

As células-tronco mesenquimais (MSCs – *Mesenchymal Stem Cells*) são células multipotentes presentes em uma grande variedade de tecidos. As MSCs são capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares, como adipócitos, condrócitos e osteoblastos. Esse trabalho avaliou o efeito da morina, um flavonoide com diversas atividades biológicas e bioquímicas, sobre as funções biológicas das células-tronco derivadas de dentes decíduos esfoliados humanos (SHEDs - *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth*) e das células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSCs - *Adipose Tissue Derived Stem Cells*). As MSCs foram isoladas, caracterizadas e tratadas com morina por dois dias, para avaliar a viabilidade, e por 15 dias, para avaliar o efeito da morina no potencial de diferenciação. A morina, nas concentrações de 50, 75, 100, 125, 150 e 175µg/mL, promoveu um aumento na viabilidade das SHED. Quando as ADSCs foram avaliadas, a viabilidade celular aumentou nas células tratadas com morina, nas concentrações de 100, 125, 150 e 175µg/mL. A morina também foi capaz de diminuir o potencial de diferenciação das ADSCs, quando adicionada ao meio de diferenciação osteogênico. Essa abordagem é de grande importância na pesquisa para o desenvolvimento de novas estratégias para a terapia celular, na medicina regenerativa e engenharia de tecidos.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais, flavonoides, medicina regenerativa.

Introdução

O uso de compostos ativos de espécies vegetais demonstra ser de grande importância no desenvolvimento de tratamentos alternativos para diversas doenças (Heeba e Mahmoud, 2014; Kumar et al. 2010; Vanitha et al. 2014). Entre as substâncias ativas presentes nas plantas, estão os flavonoides, um grande grupo de metabólitos secundários presentes em todo o reino vegetal e que são muito estudados devido às suas diversas atividades biológicas já demonstradas (Bandyopadhyay et al. 2006; Gopal, 2013; Srivastava et al. 2013).

A morina (3,5,7,2,4-*pentahydroxyflavone* em inglês) (Fig. 1) é um bioflavonoide conhecido por suas propriedades terapêuticas e grande biodisponibilidade (Subash e Subramanian, 2012; Vanitha et al. 2014). Dentre as suas atividades biológicas e bioquímicas estão atividades antimutagênicas e antitumorais, anti-inflamatórias, antidiabéticas, cardioprotetoras e, principalmente, antioxidantes (Gopal, 2013; Heebaa e Mahmoudb, 2014; Kumar et al. 2014; Masek et al. 2014; Prahalathan et al. 2012).

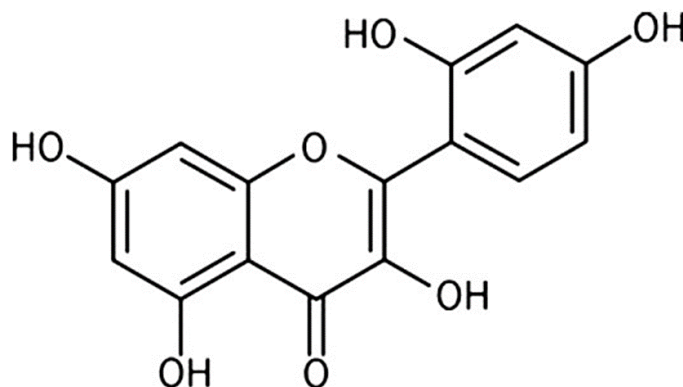


Fig. 1. Estrutura química da morina (Jakhar et al. 2014)

As células-tronco mesenquimais (MSCs) são células multipotentes presentes em uma grande variedade de tecidos. As MSCs têm origem mesodérmica e são capazes de dar origem a vários tipos celulares com células do tecido ósseo, cartilaginoso e adiposo. Essas células são capazes de aderir ao plástico, adotando uma morfologia fibroblastoide e, sob condições especiais, diferenciam-se em adipócitos, condrócitos e osteócitos (Dominici et al. 2006). A caracterização fenotípica dessas células revela a expressão de CD29, CD44, CD73, CD105 e CD166 e ausência de marcadores de linhagem hematopoética, tais como CD34, CD45 e HLA-DR (Pittenger et al. 1999).

A polpa dos dentes decíduos humanos, também chamados de “dentes-de-leite”, são fontes das chamadas SHEDs (*Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth* - células-tronco de dentes

decíduos esfoliados humanos). O uso de dentes decíduos como fonte de MSCs apresenta algumas vantagens em relação a outras fontes. Uma das vantagens é a obtenção de células com mínimo dano invasivo ao doador, uma vez que os dentes são descartados após o processo natural de substituição (Miura et al. 2003). A capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares e a alta capacidade proliferativa tornam as SHEDs uma fonte atrativa para utilização em pesquisas na área de engenharia tecidual (Giordano et al. 2011; Kanafi et al. 2013). As células-tronco humanas obtidas de tecido adiposo (ADSCs- *Adipose Tissue Derived Stem Cells*) são muito utilizadas devido à sua fácil obtenção, uma vez que são isoladas a partir de tecido adiposo que seria descartado (Hung et al. 2014) geralmente proveniente do processo de lipoaspiração. Além disso, as ADSCs apresentam como vantagens a fácil e rápida proliferação celular, por longo período de cultivo, além de multipotencialidade e tolerância a condições de hipóxia (Koellensperger et al. 2014).

A formação óssea é controlada por diversos fatores biológicos, como citocinas, hormônios e fatores de crescimento, regulando a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos. A estimulação da diferenciação em osteoblastos a partir de células-tronco tem sido sugerida como uma opção terapêutica na prevenção e/ou tratamento de doenças ósseas, como a osteoporose (Schilling et al. 2014). Estudos mostraram que flavonoides e outros compostos derivados de plantas foram capazes de promover a proliferação e a diferenciação de osteoblastos a partir de células-tronco (Schilling et al. 2014; Srivastava et al. 2013; Ying et al. 2014).

Estudos do efeito de flavonoides sobre as funções biológicas das MSCs são de grande importância para a medicina regenerativa, a fim de obter novos tratamentos para a regeneração de tecidos lesados. Atualmente, muitos estudos têm como foco a influência de flavonoides sobre as células-tronco (Schilling et al. 2014; Srivastava et al. 2013; Ying et al. 2014). Sendo assim, considerando as propriedades biológicas da morina e a capacidade de diferenciação e proliferação das células-tronco, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do flavonoide morina em células-tronco mesenquimais, provenientes de dois diferentes tecidos (dente e gordura), sobre a sua influência na viabilidade, citotoxicidade e diferenciação celulares.

Materiais e Métodos

Materiais

Os produtos utilizados foram Soro Fetal Bovino (SFB) (CULTILAB, SP, Brasil), Rh - TGF- β -1 (Peprotech). Foram adquiridos da Sigma-Aldrich: morina, meio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) baixa glicose, penicilina e estreptomicina, solução de tripsina-EDTA 10x,

dexametasona, ácido ascórbico 2-fosfato (ASAP), Suplemento Líquido ITS (100x), insulina de pâncreas bovino, indometacina, rosiglitazona, hidrato de sal dissódico β -glicerofosfato, os corantes (*Alcian Blue 8GXG*, *Oil Red O* e *Alizarin Red S*) e o MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). O kit para LDH (Liquiform Ref.: 86-1 / 100) foi obtido da Labtest Diagnóstica SA.

Análise cromatográfica da morina

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada para verificar se havia produtos de degradação da morina e para a confirmação da pureza do produto utilizado. O pó da morina foi solubilizado em metanol e filtrado em membrana de fluoreto de polivinilideno, de 0,45 μ m (Millipore, EUA). Foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu, com coluna cromatográfica Waters Nova-Pak C18 acoplada à pré-coluna Waters Nova-Pak C18 60A. Para a fase móvel utilizou-se a mistura água:acetonitrila (30:70, v:v) acidificada (ácido ortofosfórico, 0,2%) com fluxo de 1mL/min e detecção por ultravioleta a 260nm e 350nm, conforme metodologia descrita por Nunes e colaboradores (2014). Após, calculou-se a área sob a curva (ASC) que avalia e indica quantitativamente o produto analisado. Para avaliação da ASC, a morina foi solubilizada em metanol nas seguintes concentrações: 1, 10, 50, 100 e 200 μ g/mL e analisada por CLAE.

Isolamento, cultivo e caracterização celular

- Células-tronco mesenquimais isoladas a partir de dentes decíduos esfoliados humanos

As amostras de três dentes decíduos humanos foram obtidas em parceria com o Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os responsáveis pelos pacientes assinaram um termo de consentimento aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob o CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) número 36403514.6.0000.5347.

Para o isolamento celular, a polpa dentária fresca foi coletada a partir de dentes decíduos em processo de reabsorção. Imediatamente após a coleta, os dentes foram imersos em meio de cultura, composto por DMEM, 2,5g/L de Hepes, 10% de SFB, 100U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 0,25 μ g/mL de anfotericina. Em capela de fluxo laminar, cada polpa dentária foi cuidadosamente separada do tecido dentário e digerida em solução de 0,2% de collagenase de tipo I. As células de cada dente foram semeadas em um poço de uma placa de cultivo de 12 poços. O meio

foi substituído após 24 horas, a fim de isolar as células aderentes e remover as não aderidas. Após esse procedimento, o meio foi trocado aproximadamente a cada 3 dias para permitir o crescimento celular saudável. As células foram mantidas a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂, até atingirem 90% de confluência. Em seguida, as culturas foram tripsinizadas usando-se 0,05% de tripsina/EDTA e semeadas novamente na densidade de 5.000 células/cm². Na quinta e terceira passagens, as SHEDs e as ADSCs, respectivamente, foram caracterizadas e utilizadas nos experimentos descritos abaixo. As MSCs foram mantidas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB), 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 0,25µg/mL de anfotericina, em uma atmosfera saturada de água a 5% de CO₂, à temperatura de 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada 3 ou 4 dias e as células foram cultivadas até atingirem aproximadamente 90% de confluência sendo, após, tripsinizadas com 0,05% de tripsina/EDTA.

-Células-tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo humano

Para a avaliação do efeito da morina, outro tipo de células-tronco mesenquimais foi utilizado nesse estudo, as células-tronco derivadas de tecido adiposo humano. Amostras de três pacientes submetidos a lipoaspirações e/ou lipoesculturas foram obtidas em parceria com a Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, na qual os pacientes foram esclarecidos sobre a utilização das células e, posteriormente, assinaram um termo de consentimento conforme o protocolo de número 3500/11, parecer complementar: 118/11, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, aprovado em 25/04/2011. Imediatamente após o procedimento cirúrgico, o lipoaspirado foi armazenado em recipiente de vidro estéril e transportado ao Laboratório de Hematologia e Células-tronco. Em capela de fluxo laminar, o produto de lipoaspirado foi lavado com tampão fosfato (PBS- *phosphate buffered saline*) até a remoção máxima do sangue. Após a lavagem, o lipoaspirado foi incubado com 1 mg/mL de collagenase tipo I para digerir o tecido. Após, foi utilizado meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina – Gibco; e 0,25µg/mL de anfotericina B) para inativar a collagenase e após foi realizada uma lavagem adicional. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado e colocadas em garrafa de cultivo. Após 24 horas, todo o meio de cultivo da garrafa foi retirado, para lavagem com PBS, com a finalidade de retirar resquícios de gordura. As células foram mantidas em incubadora de CO₂, a 37°C, trocando-se o meio de cultivo a cada 3 ou 4 dias.

Caracterização das SHEDs e ADSCs como células-tronco mesenquimais

A caracterização das células-tronco mesenquimais foi realizada por avaliação morfológica das células aderentes, citometria de fluxo e ensaios de diferenciação, conforme descrito a seguir.

- Perfil imunofenotípico

O perfil imunofenotípico foi realizado imediatamente após a retirada das células da garrafa de cultura utilizando-se tripsina/EDTA. As células foram contadas, ressuspensas em tampão de PBS a 10^6 células/mL e incubadas com os anticorpos contra os antígenos humanos.

Os seguintes anticorpos monoclonais, contra os marcadores de superfície celulares, foram analisados: CD14, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 e HLADR (Becton Dickinson - BD®, San Diego, CA). Os anticorpos foram conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE). Após 30 minutos de incubação no escuro, as células foram lavadas com PBS 1x para remover o excesso de anticorpo não-ligado. Controles isotípicos adequados foram usados e a exclusão de células mortas foi realizada por incubação com 7-aminoactinomycin D (7AAD). As análises foram realizadas no citômetro de fluxo FACS Aria III (Becton Dickinson) e analisadas por software FACSDiva, versão 6.0.

- Diferenciação celular in vitro

As células foram analisadas nas quintas e décimas passagens de cultivo para a sua capacidade de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos e adipócitos por meio de meios de indução, previamente descrito por Bernardi e colaboradores (2011) (adaptado). Após cerca de quatro semanas de tratamento das células com os meios de diferenciação adipogênico, condrogênico e osteogênico descritos abaixo, as culturas foram coradas, visualizadas sob microscopia óptica e fotografadas.

-- Diferenciação adipogênica

As células foram cultivadas em meio indutor de diferenciação adipogênico composto por meio DMEM/HEPES contendo 10% de SFB, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 0,25µg/mL de anfotericina B, 1µM de dexametasona, 10µg/mL de insulina, 50µM de indometacina, 1µM de rosiglitazona e 0,5mM de 3-isobutil-1-metilxantina. Após cerca de cinco semanas, a

acumulação de gotículas de triglicerídeos intracelulares foi visualizado por coloração com *Oil Red O*.

-- *Diferenciação condrogênica*

As células foram cultivadas em meio indutor de diferenciação condrogênico composto por DMEM/HEPES, 10% de SFB, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 0,25µg/mL de anfotericina B, 0,1µM de dexametasona, 10ng/mL de TGF beta1, 50nM de ácido ascórbico 2-fosfato e 1% de ITS 100x. A presença de glicosaminoglicanos foi confirmada através da coloração com *Alcian Blue* em microscopia invertida.

-- *Diferenciação osteogênica*

As MSCs foram cultivadas durante 3-4 semanas em meio DMEM suplementado com soro fetal de bovino (10%), 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, dexametasona (0,1µM), ácido ascórbico 2-fosfato (50µM) e β-glicerofosfato (15mM). A deposição de matriz mineralizada foi observada por coloração com *Alizarin Red*.

Cultivo celular com morina

-Tratamentos das SHEDs e ADSCs com a morina

Na quinta passagem, as células derivadas de dentes decíduos foram semeadas a 2.500 ou 10.000 células por poço, em placas de cultura de 96 poços. Após 2 dias, as células foram tratadas com a solução de morina nas concentrações de 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200µg/mL dissolvido em DMSO (dimetilsulfóxido) (1%) adicionada ao meio DMEM e incubadas durante 2 dias. As células derivadas de tecido adiposo foram tratadas da mesma forma que as SHEDs, porém as ADSCs foram utilizadas na terceira passagem. O controle utilizado foi o DMSO na mesma concentração, sem morina. Após 2 dias de incubação, os testes biológicos foram realizados.

Para as análises de diferenciação, ambos os tipos celulares utilizados - SHEDs e ADSCs - foram submetidas a dois tratamentos: morina adicionada ao meio de cultivo normal e morina adicionada ao meio de diferenciação osteogênico e adipogênico. Em ambos os grupos, foram testadas as doses de 0, 10 e 100µg/mL de morina dissolvida em 1% de DMSO. Como controle, foram utilizados meio de cultivo, meio de cultivo com DMSO, meio de diferenciação e meio de diferenciação com DMSO.

Testes biológicos

-Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT

A viabilidade celular foi avaliada através da redução do MTT, um ensaio colorimétrico, conforme procedimento padronizado no laboratório de pesquisa (Ferreira et al., 2014a, Ferreira et al., 2014b, Pranke et al., 2014). As MSCs foram tratadas com as seguintes concentrações de morina: 0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200µg/mL, a 37°C. Após 2 dias, as células foram incubadas com 0,25µg/mL de MTT e, após quatro horas, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e 200µL de DMSO foram adicionados por poço para dissolver os cristais formados. A absorbância foi medida a 570nm e 630nm no aparelho 250 SpectraMax® (Molecular Devices, CA, EUA), sendo os resultados calculados por subtração dos valores da absorbância (570nm-630nm). Os resultados foram expressos como percentagem de redução de MTT em relação à absorbância de células do controle (100%).

-Determinação da citotoxicidade: ensaio de liberação da lactato desidrogenase (LDH)

A medição da integridade da membrana celular foi determinada no sobrenadante da cultura utilizando o ensaio de lactato desidrogenase (LDH), com um kit de teste comercial (LABTEST) segundo padronizado no laboratório de pesquisa, de acordo com Pranke e colaboradores (2014). A cultura de células-tronco foi tratada com morina, conforme supracitado. Ao final da incubação, após 2 dias, uma alíquota de meio (cerca de 0,2mL) foi retirada para análise da liberação da LDH de acordo com as instruções do fabricante. Como controle negativo, as células cultivadas nos poços com 1% de DMSO foram utilizadas. Como controle positivo, as células cultivadas nos poços foram tratadas com Triton X-100, 1% (v/v) durante 30 minutos. O Triton X-100 provoca a morte celular permitindo a máxima liberação de LDH. As leituras foram realizadas no equipamento 560 LabMax (Teste Diagnóstica SA).

Potencial de diferenciação das células sob o efeito da morina

Para avaliar a possível capacidade da morina influenciar na diferenciação celular, 8.000 células-tronco foram semeadas em cada poço em microplacas de 96 poços. Após 2 dias de cultivo, as células foram, então, incubadas com meio de diferenciação adipogênico, com e sem morina, à temperatura de 37°C. Após 15 a 21 dias, as células tratadas com meio de cultivo DMEM (controle) e meio osteogênico, ambos com ou sem morina, foram coradas com *Alizarin red* e as células tratadas com

meio adipogênico, com ou sem morina, foram coradas com *Oil red*, a fim de observar se houve diferenciação induzida somente pela morina mesmo sem a utilização de meio indutor de diferenciação.

Quantificação da diferenciação osteogênica induzida em células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (ADSCs)

Para avaliar se houve diferença na diferenciação osteogênica das ADSCs, quando tratadas com morina, realizou-se uma quantificação do corante *Alizarin Red*. Para isso, a matriz calcificada e corada com o corante *Alizarin Red* foi dissolvida com ácido acético 10% e analisada em espectrofotômetro em 405nm.

Observação da morfologia intracelular

As MSCs, cultivadas em placas de 96 poços e tratadas como descrito acima, foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4). Após, as células foram fixadas durante 30 min com solução de paraformaldeído a 4% em PBS. As MSCs foram permeabilizadas com Triton X e coradas com 50µg/mL de rodamina/faloidina conjugada (40 minutos), lavadas com PBS e os núcleos celulares foram corados com 0,5µg/mL de 4,6-diamidino-2-fenilindole, DAPI (1 minuto). As fotografias que representam as diferentes amostras foram obtidas por microscopia fluorescente (microscópio Nikon Eclipse Ti). O corante DAPI cora o núcleo da célula de azul brilhante e a rodamina/faloidina cora a actina citoplasmática, com corante fluorescente vermelho-alaranjado.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão (DP) de três experimentos independentes e avaliados utilizando ANOVA de uma via, seguida pelo teste Bonferroni T. Diferenças significativas foram estabelecidas em $p < 0,05$ e $p \leq 0,001$. Os dados foram analisados usando o programa BioStat 5.0.

Resultados e Discussão

Determinação da pureza da morina

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em 2 comprimentos de onda (260 e 350nm) e não foram observados picos referentes a produtos de degradação ou outras impurezas. Embora as informações do fabricante indicassem pureza maior de 95% e, também, os flavonoides de estrutura molecular semelhante a morina geralmente possuem boa estabilidade química, como a morina foi obtida no ano de 2008 resolveu-se realizar a CLAE para avaliar a presença de possíveis produtos de degradação. O perfil cromatográfico da morina, em função do tempo, está indicado na Fig. 2. O cálculo da ASC demonstrou correlação linear nas diferentes diluições utilizadas ($R^2 = 0.9977$), com equação da reta $y = 33536x - 61680$ indicando curva linear.

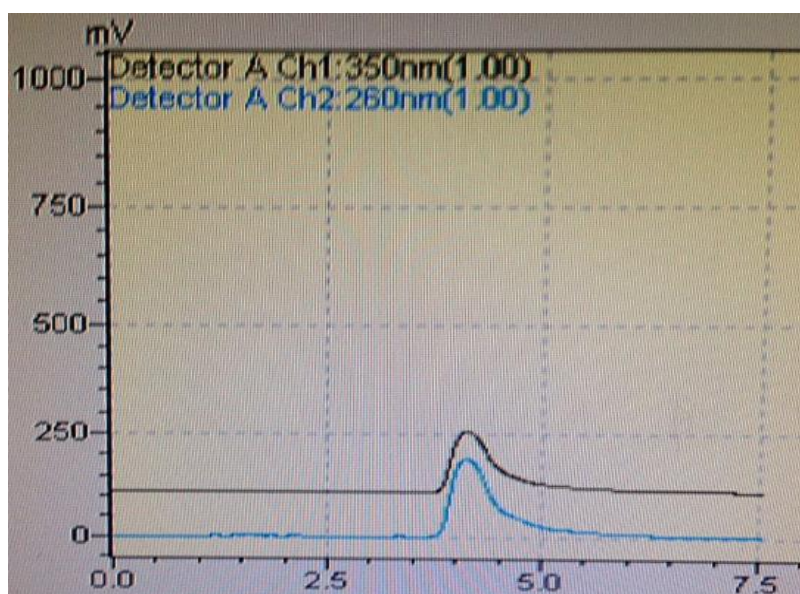


Fig. 2. Perfil cromatográfico da morina em função do tempo (minutos), analisado em dois comprimentos de onda: 350nm (em preto) e 260nm (em azul), indicando o tempo de retenção da morina de aproximadamente 4,2 minutos.

Caracterização de células-tronco mesenquimais

A caracterização das células-tronco mesenquimais foi realizada conforme os critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT). As células mostraram-se aderentes ao plástico quando mantidas em condições de cultura padrão; as MSCs expressaram positividade ($\geq 95\%$) para CD73 (ecto-5'-nucleotidase), CD90 (Thy1) e CD105 (endogлина), enquanto expressaram negativamente ($\leq 2\%$) para os marcadores de superfície CD11b, CD14, CD34, CD45 e HLA-DR e,

por fim, as MSCs tiveram potencial para se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro* (Dominici et al. 2006).

Diferenciação celular

Neste trabalho, as células de dentes decíduos humanos esfoliados foram isoladas, cultivadas e caracterizadas com sucesso como células-tronco mesenquimais, de acordo com Dominici e colaboradores (2006). As células apresentaram morfologia típica de fibroblasto e característica de aderência ao plástico (Fig. 3A, C, E). As células diferenciaram-se nas três linhagens de células mesodérmicas analisadas: a diferenciação adipogênica foi demonstrada por coloração com *Oil Red*, mostrando coloração dos vacúolos de lipídeos (Fig. 3B); a diferenciação condrogênica foi demonstrada por coloração com *Alcian blue*, indicada pela coloração azul com depósitos de glicosaminoglicanos (Fig. 3D); a diferenciação osteogênica foi demonstrada por coloração com *Alizarin Red*, indicado pelos depósitos de cálcio em vermelho (Fig. 3F).

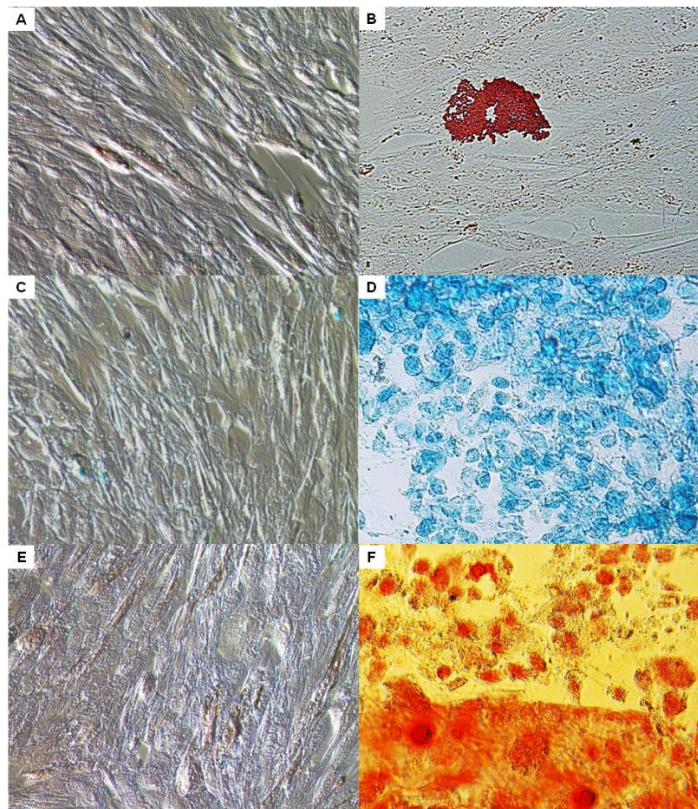


Fig. 3. Potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas de dentes decíduos nas três linhagens mesodérmicas. As células cultivadas em meio DMEM foram usadas como controle e coradas com *Oil Red* (A), *Alcian Blue* (C) e *Alizarin Red* (E). Diferenciação das SHEDs nas seguintes linhagens: (B) adipogênica, indicado por gotículas de gordura, destacadas com *Oil Red*, (D) condrogênica, demonstrada por glicosaminoglicanos corados com *Alcian Blue* e (F) osteogênica, evidenciada pela matriz calcificada corada com *Alizarin Red*. Microfotografias com aumento de 400x.

Também foi realizado o isolamento, cultura e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (ADSCs). As ADSCs apresentaram morfologia típica fibroblastoide e aderência ao plástico. Da mesma forma que as SHEDs, as ADSCs diferenciaram-se nas três linhagens de células mesodérmicas testadas: condroblastos, osteoblastos e adipócitos.

Perfil imunofenotípico

A citometria de fluxo realizada com as SHEDs demonstrou um padrão típico de marcadores de superfície para células-tronco mesenquimais, expressando positivamente CD73 (97,5%), CD90 (98,2%) e CD105 (98,7%) e com baixa expressão dos marcadores hematopoéticos CD14 (0,2%), CD34 (0%), CD45 (0,1%) e HLA-DR (0,2%).

Para as ADSCs, a citometria revelou um padrão de expressão de marcadores de superfície abaixo do padrão estabelecido pela ISCT para células-tronco mesenquimais, apresentando aproximadamente 90% de positividade para os marcadores CD73, CD90 e CD105. Ao mesmo tempo, essas células apresentaram baixa positividade para os marcadores CD14 (0,1%), CD34 (0,3%), HLA-DR (0,1%).

Efeito da morina sobre a viabilidade de células-tronco

Neste estudo, foi avaliada a possível influência da morina sobre a viabilidade das células-tronco obtidas de dentes decíduos e de tecido adiposo por meio de ensaio com MTT (Fig. 4 e 5). Nas células-tronco derivadas de dentes decíduos, em ambas as densidades celulares utilizadas, os resultados da resposta biológica da morina sobre a viabilidade celular foram os mesmos. Em comparação com o controle, as concentrações de morina de 1, 5, 10, 25 e 200µg/mL não apresentaram diferenças estatísticas no ensaio MTT. Porém, as concentrações de 50, 75, 100, 125, 150 e 175µg/mL promoveram aumento da viabilidade celular ($p \leq 0,001$) (Fig. 4).

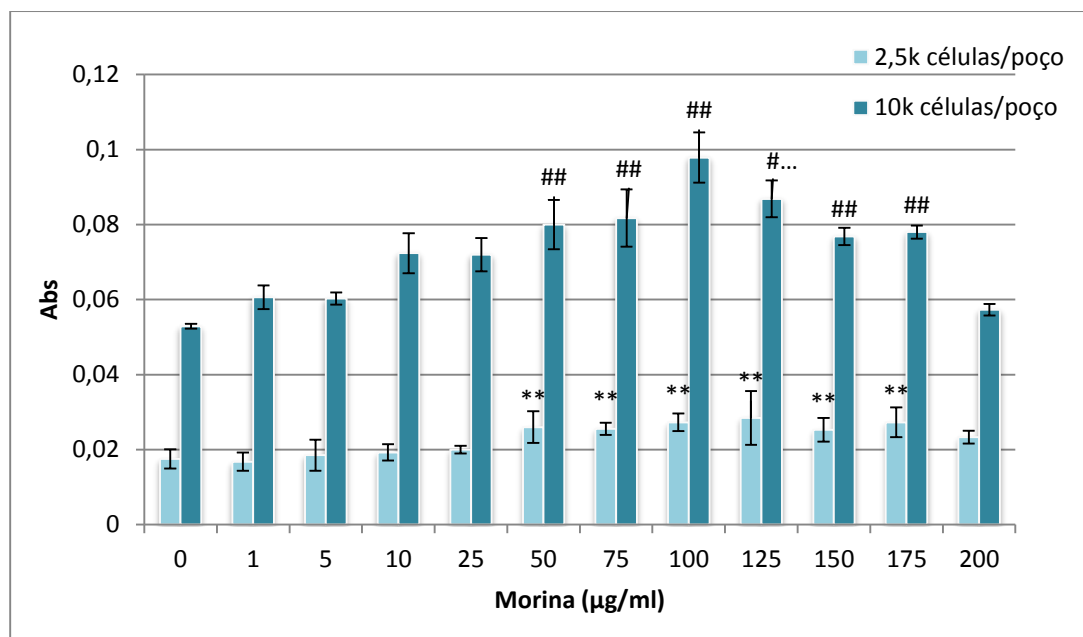


Fig. 4. Efeito da morina sobre a viabilidade de células-tronco derivadas de dentes (teste de MTT). Para esses testes, 2.500 ou 10.000 células-tronco foram semeadas em microplacas de 96 poços e após 2 dias de cultivo as células foram incubadas com morina (0-200 µg/mL) durante 2 dias, a 37°C. ** Indicam diferença estatística significativa entre o controle de 2.500 células por poço e os tratamentos com morina e ## indicam diferença estatística significativa entre o controle de 10.000 células por poço e os tratamentos com morina ($p \leq 0,001$). ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni.

Nas ADSCs, o resultado do teste de viabilidade celular foi diferente nas duas densidades celulares. Na densidade de 10.000 células/poço, a morina apresentou nas ADSCs efeitos semelhantes aos encontrados nas SHEDs, mostrando viabilidade celular estatisticamente similar ao controle nas menores concentrações de morina testadas, sendo que as concentrações de 100, 125, 150 e 175 µg/mL promoveram um aumento significativo na viabilidade celular, quando comparado com o controle (Fig. 5). Porém, o mesmo não foi observado na densidade de 2.500 células/poço, na qual nenhuma das concentrações apresentou aumento significativo na viabilidade celular.

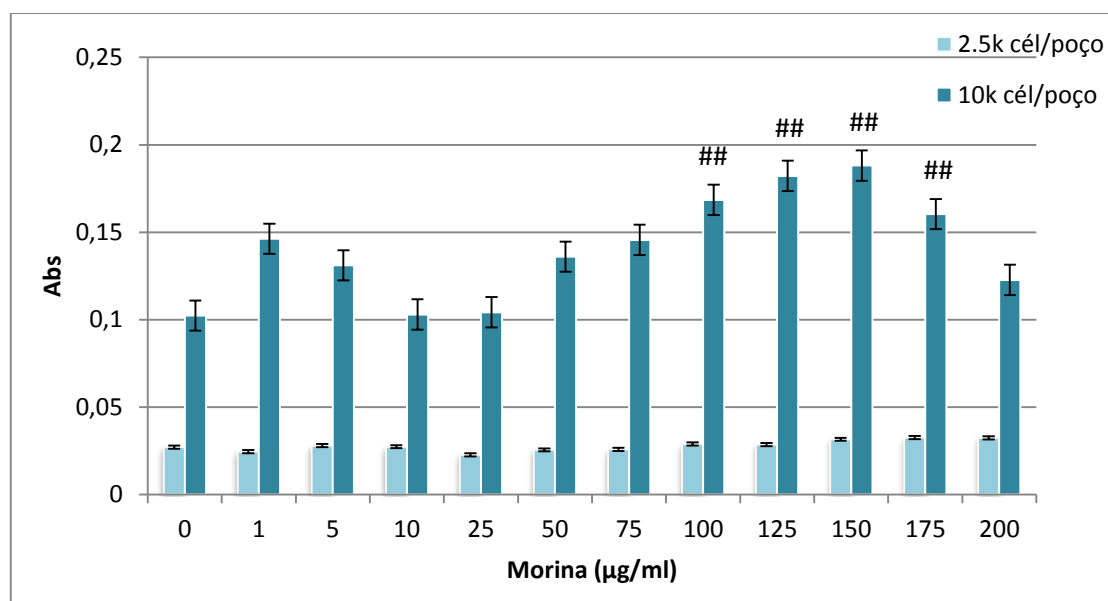


Fig 5. Efeito da morina sobre a viabilidade de células-tronco derivadas de tecido adiposo (teste de MTT). Para esses testes, 2.500 ou 10.000 células-tronco foram semeadas em microplacas de 96 poços e após 2 dias de cultivo as células foram então incubadas com morina (0-200 µg/mL) durante 2 dias, a 37°C. ## Indicam diferença estatística significativa do controle de 10.000 células por poço ($p \leq 0,001$). ANOVA em uma via com pós-teste de Bonferroni.

A influência de outros flavonoides na viabilidade de células-tronco já foi descrita em outros estudos. Srivastava e colaboradores (2013) mostraram que células-tronco mesenquimais de medula óssea (hBMSCs) apresentaram aumento da viabilidade quando incubadas com quercetina e rutina, dois flavonoides muito utilizados em pesquisas de terapia celular, os quais não foram citotóxicos. Ying e colaboradores (2014) obtiveram resultados semelhantes com o flavonoide miricetina. Assim, o presente estudo, corrobora com o encontrado na literatura, evidenciando ausência de citotoxicidade da morina e efeito proliferativo nas células avaliadas.

Efeito da morina na citotoxicidade nas células-tronco

Para avaliar o possível potencial citoprotetor da morina, a citotoxicidade foi avaliada por ensaio de liberação da enzima lactato desidrogenase (Fig. 6). Foi possível observar que, nas concentrações de 125 e 150 µg/mL de morina, ocorreu uma diminuição significativa da citotoxicidade em ambas as densidades celulares das células-tronco derivadas de dentes decíduos em comparação com as outras concentrações de morina, as quais foram estatisticamente semelhantes ao controle. Além disso, nas concentrações de 25 e 100 µg/mL de morina, observou-se uma diminuição da citotoxicidade na densidade de 2.500 células por poço. O controle de morte celular (Triton)

apresentou estatisticamente maior liberação de LDH, indicando que não houve nenhum efeito tóxico nas células tratadas com morina.

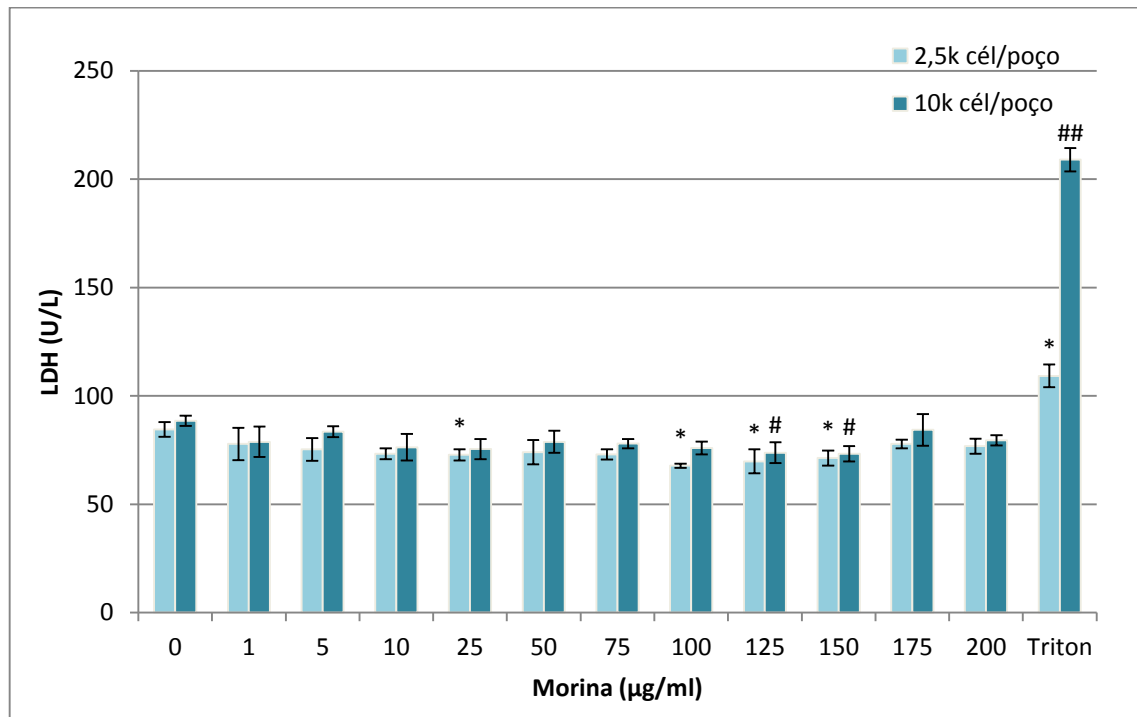


Fig. 6. Efeito citoprotetor da morina sobre as células-tronco derivadas de dentes decíduos humanos (teste de liberação da lactato desidrogenase). Para esses testes, 2.500 ou 10.000 células-tronco foram semeadas em microplacas de 96 poços e, após 2 dias de cultivo, as células foram então incubadas com morina (0-200µg/mL) durante 2 dias, a 37°C. Após, o sobrenadante foi removido e analisado para verificar a liberação da lactato desidrogenase. O Triton foi utilizado como controle de morte celular. Diferença estatística significativa do controle de 2.500 células por poço (*) ($p \leq 0,05$) e do controle de 10.000 células por poço (#) $p \leq 0,05$ e (##) $p \leq 0,01$. ANOVA em uma via com pós-teste de Bonferroni.

Esse resultado da diminuição da citotoxicidade já era esperado, devido às propriedades antioxidantes da morina e aos resultados encontrados na literatura, os quais relatam o potencial citoprotetor dos flavonoides (Braun et al., 2011).

Nas células-tronco derivadas de tecido adiposo não foi possível realizar os testes, devido a um problema com o aparelho que realiza as análises.

Efeito da morina sobre o potencial de diferenciação das células-tronco

Alguns estudos descrevem os flavonoides como substâncias que apresentam diversas propriedades biológicas e bioquímicas (Bandyopadhyay et al., 2006; Prahalathan et al., 2012; Schilling et al., 2014). Isso demonstra a importância da pesquisa desses compostos aliados à multipotencialidade das células-tronco, para que se obtenha novas alternativas na prevenção e/ou tratamento de doenças. Muitos estudos têm focado no uso de flavonoides para a engenharia de

tecidos. Alguns estudos analisaram os flavonoides como uma possível alternativa no tratamento da osteoporose, uma vez que os flavonoides geralmente aumentam o potencial de diferenciação osteogênica das MSCs (Schilling et al. 2014; Srivastava et al. 2013; Ying et al. 2014).

Nesse estudo, observou-se que, nos testes de indução a diferenciação, a morina adicionada ao meio de diferenciação osteogênico reduziu a capacidade de diferenciação em osteoblastos das células-tronco derivadas de tecido adiposo humano em um padrão dose-dependente. (Fig. 7). Além disso, quando essas mesmas células foram tratadas com morina adicionada ao meio de cultivo, sem indutores de diferenciação, não foi observada diferença significativa em relação ao controle.

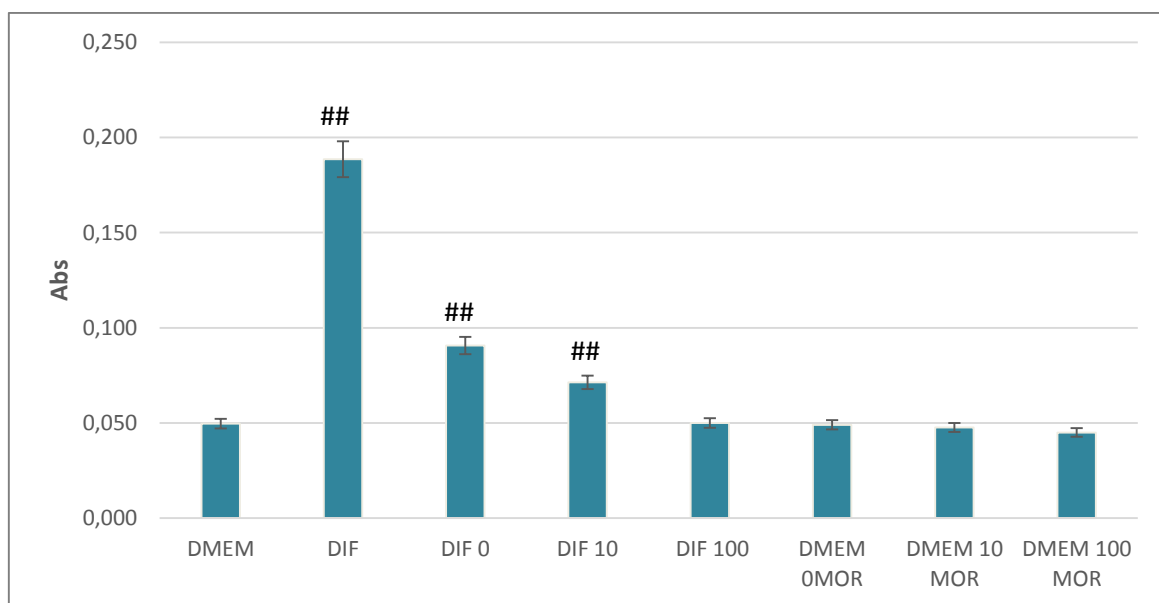


Fig. 7. Quantificação da diferenciação osteogênica induzida em células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (ADSCs). Para este teste, 8.000 células-tronco foram semeadas em microplacas de 96 poços e, após 2 dias de cultivo, as células foram então incubadas com meio de diferenciação adipogênico com ou sem morina, durante 15 dias, a 37°C. Após, realizou-se a coloração com *Alizarin Red* e a quantificação espectrofotométrica. Os dados estão expressos como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Diferença estatística significativa do DMEM (controle) (##) ($p \leq 0,001$). ANOVA em uma via com pós-teste de Bonferroni.

Não foi possível analisar o efeito da morina na diferenciação adipogênica, uma vez que as células do controle negativo também diferenciaram em adipócitos, mesmo sem os indutores. Isso pode ser explicado devido ao fato de as células derivadas de tecido adiposo possuírem genes específicos capazes de promover mais facilmente a diferenciação adipogênica (Schaffler e Buchler, 2006) o que pode ter interferido no experimento. Já nos experimentos com as SHEDs, não foi possível ter resultados conclusivos quanto à diferenciação osteogênica, uma vez que o controle positivo não diferenciou em osteoblastos para que fosse possível ser realizado o estudo comparativo.

Embora a hipótese inicial do estudo era que a morina aumentasse o potencial de diferenciação das MSCs, seguindo os resultados encontrados com outros flavonoides na literatura, os resultados obtidos mostraram que a morina causou a diminuição da diferenciação osteogênica nas MSCs, o que seria interessante ser investigado para o controle de doenças nas quais há substituição anormal de tecidos por tecido ósseo. Além disso, a morina teve efeitos biológicos importantes, aumentando a viabilidade celular e diminuindo a citotoxicidade.

Observação da morfologia intracelular

As MSCs foram cultivadas e tratadas conforme descrito anteriormente. As fotografias, obtidas por microscopia de fluorescência (microscópio Nikon Eclipse Ti), ilustram as amostras sem tratamento com morina e com tratamento de 100µg/mL. Nas imagens, é possível observar que os núcleos corados com DAPI apresentam uma coloração azul brilhante e que a actina citoplasmática apresenta-se marcada com rodamina/faloidina com uma coloração fluorescente vermelho-alaranjada (Fig. 8).

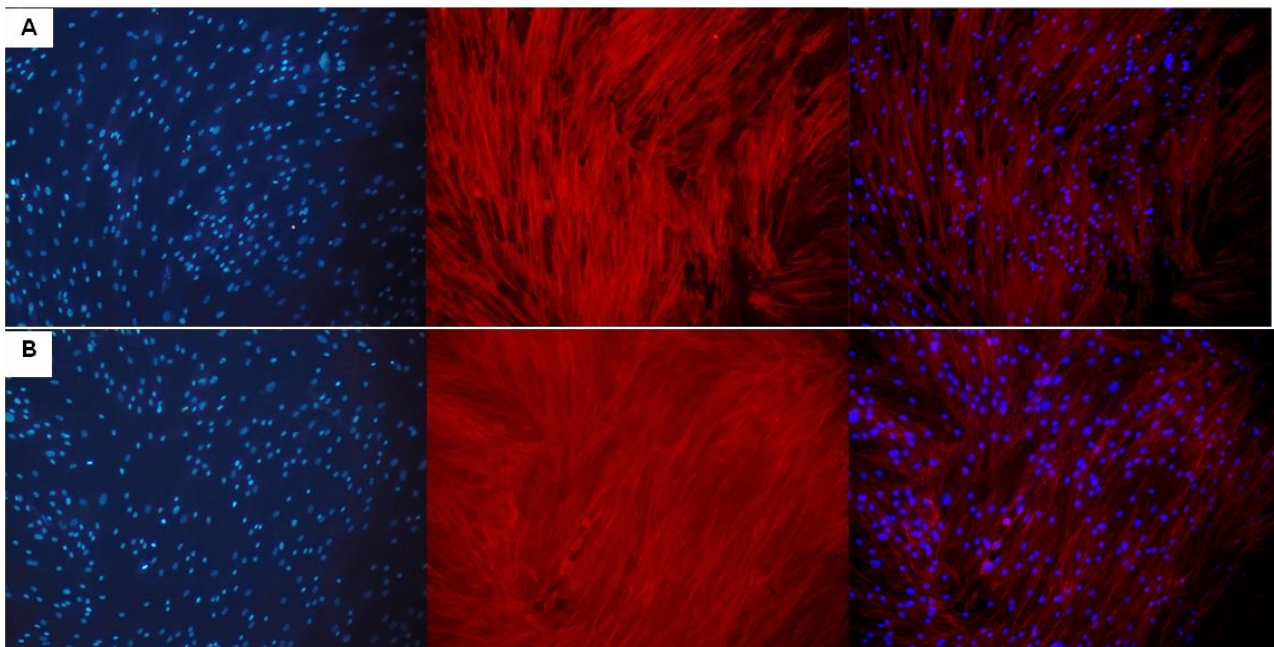


Fig. 8. Células-tronco derivadas de dentes decíduos coradas com DAPI (núcleos azuis), faloidina (citoplasma em vermelho) e sobreposição (DAPI e faloidina) da esquerda para a direita respectivamente. Em (A) sem tratamento com morina e em (B) com tratamento de 100µg/mL. Microfotografias com aumento de 400x.

Conclusões

O presente estudo mostrou o efeito da morina sobre as células-tronco mesenquimais, tanto no aumento da viabilidade celular e diminuição da citotoxicidade, quanto na diminuição da diferenciação osteogênica. O cultivo das células-tronco derivadas de dentes decíduos bem como células-tronco derivadas de tecido adiposo em associação com o tratamento da morina demonstrou aumento da viabilidade das MSCs pelo teste MTT. O tratamento com morina em células-tronco derivadas de dentes decíduos esfoliados humanos (SHEDs) apresentou efeito citoprotetor e pode ser uma vantagem para uso na medicina regenerativa. Além disso, a morina diminuiu a diferenciação osteogênica em células-tronco derivadas de tecido adiposo humano. Como perspectivas futuras, a incorporação desse flavonoide em matrizes de nanofibras poliméricas, servindo de suporte para o crescimento das células-tronco, poderá ser uma importante estratégia na engenharia de tecidos, visando o tratamento de lesões teciduais.

Referências

- Bandyopadhyay S., Lion, J-M., Mentaverri, R., Ricupero, D.A., Kamel, S., Romero, J.R., Chattopadhyay, N., 2006. Attenuation of osteoclastogenesis and osteoclast function by apigenin *Biochemical pharmacology* 72, 184–197.
- Bernardi, L., Luisi, S.B., Fernandes, R., Dalberto, T.P., Valentim, L., Chies, J.A.B., Fossati, A.C.M., Pranke, P., 2011. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *JOE* 37, 973-979.
- Dominici, M., Le, B.K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-317.
- Ferreira, S.A., Pereira, D.P., Maurmann, N., Pranke, P., 2014a. Electrospinning of PLGA with morin fiber scaffolds to cultivate with stem cells. In: *TERMIS-AM Annual Conference*.
- Ferreira, S.A., Pereira, D.P., Maurmann, N., Pranke, P., 2014b. Morin increases the viability of mesenchymal stem cells in culture and when incorporated in a nanostructured scaffold. In: *Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO)*.
- Gopal, J.V., 2013. Morin Hydrate: Botanical origin, pharmacological activity and its applications: A mini-review. *Pharmacognosy Journal*, 5, 123-126.

Giordano, G., La Monaca, G., Annibali, S., Cicconetti, A., Ottolenghi, L., 2011. Stem cells from oral niches: a review. *Ann Stomatol.*, 2(1-2), 3-8.

Hamburger, M., Hostettmann, K., 1991. Bioactivity in plants: .the link between phytochemistry and medicine). *Phytochemistry*, 30, 3864-3874.

Heeba, G., Mahmoud, M., 2014. Therapeutic potential of morin against liver fibrosis in rats: Modulation of oxidative stress, cytokine production and nuclear factor kappa B. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37, 662-671.

Hung, M., Wen, M., Huang, Y., Chen, G., Chou, M., Yang, V., 2014. Fascia tissue engineering with human adipose-derived stem cells in a murine model: Implications for pelvic floor reconstruction. *Journal of the Formosan Medical Association*, 113, 704-715.

Kanafi, M.M., Pal, R., Gupta, P.K., 2013. Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of dental pulp stem cells. *Cell Biol Int.*, 37(2), 126-136.

Jakhar, R., Paul, S., Chauhan, A., Kang, S., 2014. Morin hydrate augments phagocytosis mechanism and inhibits LPS induced autophagic signaling in murine macrophage. *International Immunopharmacology*, 22, 356-365.

Koellensperger, E., Bollinger, N., Dexheimer, V., Gramley, F., Germann, G., Leimer, U., 2014. Choosing the right type of serum for different applications of human adipose tissue–derived stem cells: influence on proliferation and differentiation abilities. *Cytherapy*, 16, 789-799.

Kumar, R., Kumar, K., Salini, K., Devaraj, S., 2014. Morin accelerates proliferative inhibition via NF- κ B mediated transcriptional regulation of apoptotic events during chemical carcinogen induced mammary cancer in rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4, 277-290.

Li, C., Luo, T., Zheng, Z., Murphy, A.R., Wang, X., Kaplan, D.L., Curcumin-functionalized silk materials for enhancing adipogenic differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia*, 11, 222–232.

Masek, A., Chrzescijanska, E., Zaborski, M., 2014. Electrooxidation of morin hydrate at a Pt electrode studied by cyclic voltammetry. *Food Chemistry*, 148, 18–23.

Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., Shi, S., 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 5807-5812.

Nunes, J., 2014. Xantonas, benzopiranos e floroglucinois diméricos em culturas de tecidos de espécies de hypericum nativas do sul do Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre.

Prahalathan, P., Kumar, S., Raja, B., 2012. Effect of morin, a flavonoid against DOCA-salt hypertensive rats: a dose dependent study. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 443-448.

Prahalathan, P., Kumar, S., Raja, B., 2012. Morin attenuates blood pressure and oxidative stress in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: A biochemical and histopathological evaluation. *Metabolism Clinical and Experimental*, 61, 1087–1099.

Pranke, P., Maurmann, N., Ferreira, S.A., Pereira, D.P., Lund, D.G., 2014. Cytotoxic effect of copaiba oil in stem cells. In: ISSCR 12th Annual Meeting: International Society for Stem Cell Research, Vancouver, Canada. Late Breaking Poster Abstracts. p. 13-14.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-147.

Schaffler, A., Buchler, C., 2006. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells—Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. *Stem Cells*, 25, 818-827.

Schilling, T., Ebert, R., Raaijmakers, N., Schütze, N., Jakob, F., 2014. Effects of phytoestrogens and other plant-derived compounds on mesenchymal stem cells, bone maintenance and regeneration. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 139, 252– 261.

Srivastava, S., Bankar, R., Roy, P., 2013. Assessment of the role of flavonoids for inducing osteoblast differentiation in isolated mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Phytomedicine*, 20, 683– 690.

Steffens, D., Lersch, M., da Rosa, A.R., Scher, C., Crestani, T., Morais, M.G., Costa, J.A.V., Pranke, P., 2013. A new biomaterial of nanofibers with the microalga spirulinas scaffolds to cultivate with stem cells for use in tissue engineering. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9, 710-718.

Subash, S., Subramanian, P., 2012. Protective effect of morin on lipid peroxidation and lipid profile in ammonium chloride-induced hyperammonemic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 103-106.

Vanitha, P., Uma, C., Suganya, N., Bhakkiyalakshmi, E., Suriyanarayanan, S., Gunasekaran, P., Sivasubramanian, S., Ramkumar, K., 2014. Modulatory effects of morin on hyperglycemia by attenuating the hepatic key enzymes of carbohydrate rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37, 326–335.

Ying, X., Chen, X., Feng, Y., Xu, H., Chen, H., Yu, K., Cheng, S., Peng, L., 2014. Myricetin enhances osteogenic differentiation through the activation of canonical Wnt/ β catenin signaling in human bone marrow stromal cells. *European Journal of Pharmacology*, 738, 22–30.

Zhang, J., Li, G., Chan, C., Meng, C., Lin M.C., Chen, Y., He, M., Leung, P., Kung, H., 2010. Flavonoids of *Herba Epimedii* regulate osteogenesis of human mesenchymal stem cells through BMP and Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 314, 70–74.